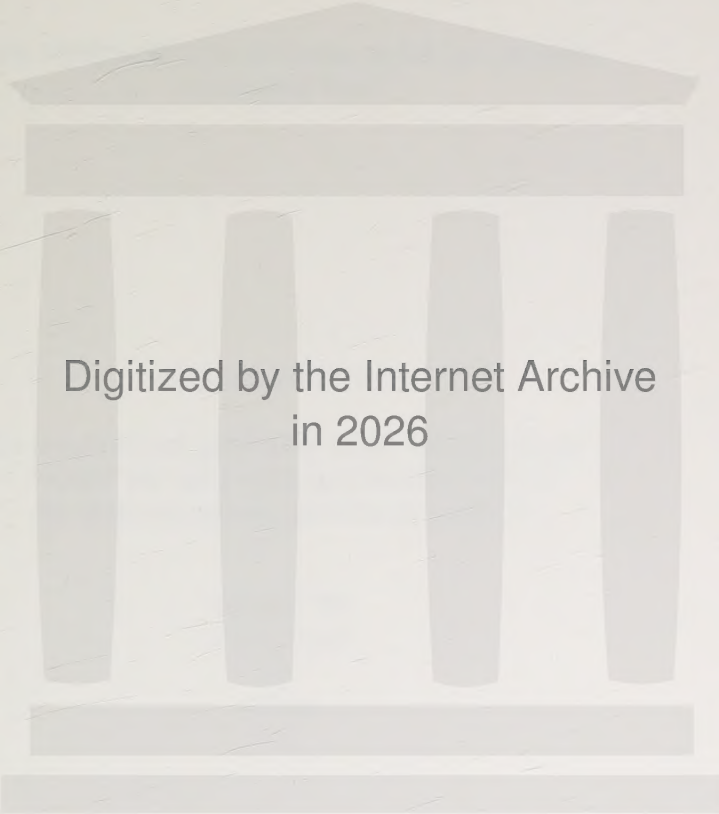


ZUR BIOLOGISCHEN ACTH-BESTIMMUNG
AN DER AKUT HYPOPHYS-
EKTOMIERTEN RATTE

Werner Pister

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0115

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. E. BUCHBORN

ZUR BIOLOGISCHEN ACTH-BESTIMMUNG AN DER AKUT HYPOPHYS-
EKTOMIERTEN RATTE⁺⁾

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
WERNER PISTER
AUS
MÜNCHEN
1973

⁺⁾ MIT UNTERSTÜTZUNG DER DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT (SFB 51)

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Scriba
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.5.1974



Herrn Prof. Dr. med. P. C. Scriba danke ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und seine Geduld, die das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht hat.

Herrn Priv. Doz. Dr. P. Schwandt und seinen Mitarbeitern danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. O.A. Müller danke ich für seine verständnisvolle Hilfe.

Fr1. Haag danke ich für die Ausführung der photographischen Arbeiten.

Fr1. R. Fröhlich danke ich für ihre unermüdliche Assistenz bei den Versuchen.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methoden und Vorversuche	5
2.1 Operative Vorbereitung der Ratten und Versuchsanordnung	5
2.1.1 Tiere und Material	5
2.1.2 Narkose	6
2.1.3 Hypophysektomie auf parapharyngealem Weg	7
2.1.4 Arterielle und venöse Katheterisierung	7
2.1.5 Infusionen und Blutentnahmen	8
2.2 Fluorimetrische Corticosteronbestimmung	9
2.2.1 Laborgeräte und Reagentien	9
2.2.2 Methode	10
2.2.3 Behandlung der Proben	11
2.3 Ergebnisse der Corticosteronbestimmung	11
2.3.1 Corticosteroneichkurve	11
2.3.2 Die Richtigkeit der Methode	14
2.3.3 Die Reproduzierbarkeit der Methode	15
2.4 Statistik	15
2.4.1 Genauigkeit der Eichkurve	15
3. Ergebnisse	16
3.1 Aufstellen einer ACTH-Eichkurve	16
3.1.1 Diskussion	21
3.2 ACTH-Spiegel von Patienten mit Nelsontumoren	22
3.2.1 Untersuchungsgang	22
3.2.2 Patientengut und Kasuistik	23
3.2.3 Ergebnisse und Diskussion	25
3.3 Ergebnisse über die Untersuchung von lipoid-mobilisierenden Peptidfraktionen aus Schweinehypophysen auf ACTH-Aktivität und Diskussion	29
4. Zusammenfassung	34
5. Literaturverzeichnis	35
6. Lebenslauf	41

1. Einleitung

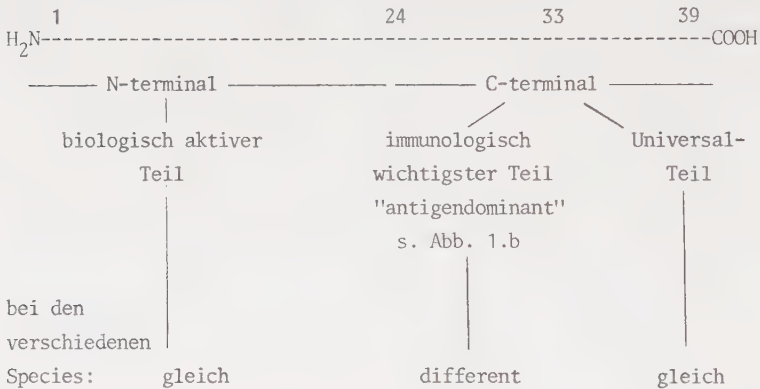
Ph. E. Smith (35) zeigte erstmals 1930, daß die Hypophysektomie einer Ratte zur Nebennierenatrophie führt, andererseits die Implantation von Hypophysenvorderlappen diese Atrophie wieder beseitigt. Diesem Stoff aus dem Hypophysenvorderlappen mit dieser Wirkung wurde der Name adrenocorticotropes Hormon (= ACTH) gegeben. Bereits drei Jahre später gelang es nahezu gleichzeitig Collip und Mitarbeitern (4), sowie Anselmino und Hoffmann (1), in Acetontrockenpulver von Rinderhypophysenvorderlappen diesen Stoff anzureichern. Li, Evans und Simpson (12) isolierten 1942 ein offenbar homogenes Peptid aus Schafshypophysen mit ACTH-Aktivität und einem Molekulargewicht von etwa 20.000. Durch Verbesserung der Methodik gelang es schließlich 1954, ein hochgereinigtes Polypeptid mit ACTH-Aktivität aus den Hypophysen von Schaf, Schwein und Mensch zu gewinnen (13). Ein Jahr darauf waren es wieder Li und Mitarbeiter (14), die die Struktur der ACTH-Moleküle aufklärten. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl das 1955 untersuchte Schweine- und Schafs-ACTH, als auch Rinder-ACTH (1958) ein einkettiges Polypeptid mit 39 Aminosäuren ist (Abb. 1a). Es zeigte sich, daß die Strukturunterschiede der ACTH-Moleküle der verschiedenen Species auf den offenbar artspezifischen C-terminalen Teil (Position 25 - 39) der Aminosäuresequenz des Moleküls beschränkt sind. Dagegen ist die biologische Wirksamkeit im N-terminalen Teil (1 - 24) des Peptides zu suchen (Abb. 1b). Antikörper sind für beide Abschnitte des Moleküls bekannt. Es gelang Li (15) die Synthese eines Peptides mit den ersten 19 Aminosäuren bei voller ACTH-Wirkung. Schwyzer (31) synthetisierte zunächst ein 1 - 24 Peptid und schließlich das vollständige Polypeptid mit 39 Aminosäuren (32).

Abbildung 1

Vereinfachte Darstellung der ACTH-Struktur und ihrer chemischen bzw. biologischen Aufgliederung

ACTH wird von 39 Aminosäuren aufgebaut. Dabei bilden die Kettenglieder 1 - 24 als N-terminaler Teil die immer gleich bleibende - biologisch aktive - Gruppierung. Im Bereich der Aminosäuren 25 - 33 ist innerhalb des C-terminalen Teiles (25 - 39) die speciesunterschiedliche und immunologisch wichtigste Gliederung zu finden.

1.a Schematische Aufgliederung des ACTH-Moleküls:



1.b Der speciesabhängige Molekülanteil:

	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Schwein	Asp	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Ala	Glu
Schaf	Ala	Gly	Glu	Asp	Asp	Glu	Ala	Ser	Glu
Rind	Asp	Gly	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Ala	Glu
Mensch	Asp	Ala	Gly	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden ACTH-Bestimmungsmethoden für Hypophysenextrakte bzw. Plasma entwickelt. Sie beruhten zunächst auf den biologischen Wirkungen von ACTH. Eine Übersicht der wesentlichen Arbeiten mit der Angabe der kleinsten meßbaren ACTH-Menge zeigt Tabelle 1. Sayers (27) verwandte 1948 die Verringerung der Ascorbinsäurekonzentration im Nebennierengewebe der hypophysektomierten Ratte nach intravenöser Gabe von ACTH. Dabei verglich er die Konzentrationen in linker und rechter Nebenniere eines Tieres, wobei eine Nebenniere vor, die andere nach dem Versuch entfernt und auf ihren Ascorbinsäuregehalt untersucht wurde. Diese Bestimmung wurde auch für die Festsetzung des 1. internationalen ACTH-Standards angewandt, wobei jedoch subcutan injiziert wurde. Empfindlicher war die Bestimmung von Munson und Töpel 1958 (19), die nicht den Ascorbinsäureschwund im Nebennierengewebe, sondern ihren Anstieg im über einen bestimmten Zeitraum geflossenem Nebennierenvenenblut ermittelten. In vitro-Techniken (Saffran und Schally, 1955, 26) mit Nebennierenextrakten zeigten nicht die gewünschte Verbesserung. Den Anstieg von 17-Hydroxycorticosteroiden im Serum verwandten erstmals Nelson und Hume 1955 (21) als Parameter. Die Größe der Versuchstiere, es waren Hunde, brachte jedoch keine befriedigende untere Nachweisgrenze für ACTH. Erst eine fluorimetrische Corticosteronbestimmung von Silber, Bush und Oslapas (34), sowie Zenker und Bernstein (39) 1958 ermöglichte eine genauere und empfindlichere Meßmethode und somit den Übergang auf kleinere Versuchstiere. So maßen Guillemin, Clayton, Smith und Lipscomb (9) 1958 den Corticosteronanstieg im peripheren Blut bei Ratten. Ein Ersatz der Hypophysektomie durch Blockierung der Hypophyse mit Dexamethason von Pfeiffer et al. (23) erbrachte keine Verbesserung. Dies war jedoch Lipscomb und Nelson (16) 1959 möglich, als sie zur Corticosteronbestimmung direkt das Nebennierenvenenblut benutzten. Annähernd gleiche Ergebnisse erreichten Williams und Liddle (38) 1960 u. a.. Bei uns wurde seit 1966 in Modifikationen mit dieser Methode gearbeitet (10) und verschiedene klinische und experimentelle Fragestellungen untersucht (11, 33). Zwischenzeitlich wurde eine verbesserte fluorimetrische Cortisolbestimmung aufgebaut (Gerb, 7).

Tabelle 1

Methoden zur Bestimmung von ACTH

Methoden	Autor	Kleinste nachweisbare ACTH Menge mE/Inj.
1. Ascorbinsäureschwund der NNR bei hypophysekt. Ratten	Sayers (27)	0,25
2. Ascorbinsäureanstieg im NNV-Blut bei hypophys- ekt. Ratten	Munson (19)	0,04
3. Cortisolanstieg im NNV-Blut von Hunden	Nelson (21)	1,0 - 3,0
4. Corticosteronanstieg im peripheren Blut hypo- physekt. Ratten	Guillemin (9)	0,2 - 1,0
5. Corticosteronanstieg im NNV-Blut hypophysekt. Ratten	Lipscomb (16)	0,05 - 1,0
6. Dto.	Kluge (11)	0,0086

Es war Ziel dieser Arbeit, diese Cortisol-Methode auch für die Corticosteronbestimmung im Rattenblut zu modifizieren und damit vielleicht eine genauere und empfindlichere biologische ACTH-Bestimmung zu erhalten. Neben diesem methodischen Problem sollten zwei Fragestellungen bearbeitet werden, nämlich:

1. Plasma ACTH-Spiegel bei Patienten mit sogenannten Nelson-Tumoren (20), wobei es sich um hyperplasiogene Hypophysenadenome nach bilateraler Adrenalectomie wegen eines Cushingsyndroms handelt; da-

bei sollte untersucht werden, inwieweit die ACTH-Spiegel dieser Patienten noch durch eine Insulinhypoglykämie (als Stimulationstest) bzw. eine Dexamethasongabe (als Suppressionstest) beeinflussbar waren.

2. Es war zu untersuchen, inwieweit das von Schwandt et al. (30) 1971 aus Schweinehypophysen dargestellte lipolytisch wirksame Polypeptid "Peptid A" und seine Vorstufen biologische ACTH-Aktivität zeigten. Da ACTH selbst eine starke lipolytische Wirkung besitzt, sollte die ACTH-Aktivität und damit die eventuell zum Teil ACTH-bedingte lipolytische Wirksamkeit dieser Fraktionen quantifiziert werden.

2. Methoden und Vorversuche

2.1 Operative Vorbereitung der Ratten und Versuchsanordnung

2.1.1 Tiere und Material

Männliche Albinoratten, Stamm BR 46 Wistar II, Gewicht 200 - 300 gr., Fa. Brünger, Bokel/Bielefeld.

Die Tiere wurden bei einer konstanten Temperatur (24°C) und Futter ad libidum gehalten.

Operationsgeräte:

Binokularmikroskop 10fach, Fa. Leitz, Wetzlar,
je ein(e) stumpfe Pinzette, spitze kleine Pinzette,
gebogener stumpfer Haken, spitzer Haken,
gebogene spitze Pinzette,
abgerundete Schere, spitze kleine Schere,
Zahnbohrer, rund, Nr. 7 und 8,

Sauger: gebogene Glaskanülen, Innendurchmesser am freien Ende ca. 1 mm, die über eine Wolf'sche Flasche an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurden.

Perfusionsgerät mit Rekordspritze 10 ml, Fa. Braun, Melsungen,

Einmalkanülen Nr. 14, Fa. Braun, Melsungen,
Arterielle Katheter, Größe OR, mit internationalem Spritzenansatzstück,
Fa. Braun, Melsungen,
Venöse Katheter, Außendurchmesser 0,9 mm, Innendurchmesser 0,69 mm,
Fa. Vogel, Gießen.

Präparate:

Amylenhydrat, Fa. Merck AG, Darmstadt
Avertin, (2, 2, 2 Tribromäthanol), Fa. Fluka AG, Buchs/Schweiz,
Urethan, Fa. Merck AG, Darmstadt
Vetren, Fa. Promonta, Hamburg.

2.1.2 Narkose

Die Narkose erfolgte zu den jeweiligen Operationen nach folgendem Schema:

2.1.2.1 zur Hypophysektomie:

Ätherrausch -

2,5 % Avertinlg. intraperitoneal, 0,8 ml / 100 gr. KG.

Dauer des Toleranzstadiums ca. 20 Minuten.

2.1.2.2 zum Katheterisieren:

Ätherrausch -

2,5 % Avertinlg. intraperitoneal, 0,3 ml / 100 gr. KG

10 % Urethanlg. subcutan am Rücken, 0,9 ml / 100 gr. KG.

Dauer des Toleranzstadiums von der zweiten Minute bis mehrere Stunden.

Der Ätherrausch wurde in einem geschlossenen Glasgefäß, in dem mit Äther getränkter Zellstoff lag, verabreicht.

Die 2,5 % Avertinlg. wurde täglich neu aus einer 100 % Stammlösung von Avertin in Amylenhydrat durch Verdünnung mit aqua dest. hergestellt.

Die Urethanlg. wurde täglich aus der Trockensubstanz mit aqua dest. neu angesetzt.

2.1.3 Hypophysektomie auf parapharyngealem Weg

Es wurde die Methode nach Freud (6) in Abwandlung (10) angewandt: Die narkotisierte Ratte wird, auf dem Rücken liegend und den Kopf zum Operateur gerichtet, mit einer durch die Schneidezähne gelegten Schlaufe fixiert. Mit einem medianen Hautschnitt am Hals und durch stumpfe Präparation wird die Mittelsehne des linken m. digastricus freigelegt. Ab jetzt wird das Binokularmikroskop verwandt. Lateral der Mittelsehne, cranial des ductus submaxillaris und den Maxillargefäßen wird zwischen m. masseter und dem m. omohyoideus mit gebogener Pinzette und gebogenem Haken in die Tiefe gegangen, bis der, als weisser Knorpelhöcker sichtbare, processus mesoptergoideus dargestellt ist. Mit Pinzette und Sauger wird nach mediokaudal auf die Schädelbasis vorgegangen, bis der Schnittpunkt der blauen synchondrosis sphenooccipitalis mit einem vom foramen occipitale kommenden, knöchernem, medianem Längswulst zu sehen und die Schädelbasis mediocranial von diesem Schnittpunkt freipräpariert ist. Hier wird mit einem Bohrer Nr. 7 vorgebohrt, dann mit einem Bohrer Nr. 8 die Schädelbasis ganz durchbohrt, jedoch ohne dabei die dura mater zu verletzen. Zur Abdichtung der Knochensinus, also zur Vermeidung von Knochenblutungen, wird dem Bohrer eine Kappe aus einer Bienenwachs-Paraffinmischung (3 : 1) aufgesetzt, die während des Bohrvorgangs mehrmals erneuert wird. Anschließend wird die Dura mit einem spitzen Haken aufgerissen und die Hypophyse mit dem Sauger abgesaugt, wobei darauf zu achten ist, daß der Sog nicht zu stark ist, da sonst Blutungen gesetzt werden. Sodann wird der Hautschnitt mit Klammern verschlossen. Die Vollständigkeit der Hypophysektomie wurde optisch nach Versuchsende durch eine Revision, d. h. Entfernen von Schädeldach und Gehirn und Einsicht auf das Operationsgebiet von der Gehirnseite aus gesichert. Außerdem war die Höhe der Corticosteronbasiswerte ein sicherer Anhalt für Erfolg oder Mißerfolg der Hypophysektomie.

2.1.4 Arterielle und venöse Katheterisierung

Dazu liegt die Ratte auf dem Rücken, den Schwanz zum Operateur gerich-

tet, wobei die Hinterpfoten am Brett fixiert wurden. Über dem linken lig. inguinale wird ein pfenniggroßes Hautstück entfernt und das darunterliegende Fettgewebe nach Abbinden einer darin befindlichen Arterie herausgeschnitten. Unter Verwendung des Binokularmikroskopes wird die Arteria und Vena femoralis freipräpariert. Mit Nähseide wird an beiden Gefäßen jeweils eine distale und eine proximale Ligatur angebracht, wobei sich zwischen den Ligaturen keine weitere Gefäßabzweigung befinden darf. Zuerst wird die Arterie katheterisiert. Durch Fixieren des distalen Fadens (provisorisch) und Zug am proximalen Faden wird die Arterie abgebunden. Sodann wird mit einer Kanüle Nr. 14 das Gefäß eröffnet und der arterielle Katheter, der zuvor mit Heparin gespült wurde, ca. 7 cm weit eingeführt. Durch die bereits an den Katheter angeschlossene Spritze wird das Tier mit 50 I.E. Vetren^R/ 100 mg KG heparinisiert.

Mit der Vene wird ebenso verfahren, jedoch wenn der Katheter liegt, wird die Ratte mit einem 4 cm langen, an der linea alba verlaufenden Schnitt laparotomiert, und unter Sicht der Katheter von der vena cava in die linke Nebennierenvene vorgeschoben.

Nachdem die Katheter richtig liegen, werden die Ligaturen fest geschlossen.

Das Tier ist nun zur ACTH-Bestimmung bereit.

2.1.5 Infusionen und Blutentnahmen

ACTH-Standardlösungen bzw. die zu untersuchenden Proben unbekannter ACTH-Konzentrationen wurden mit einem Perfusor (Fa. Braun, Melsungen), über den arteriellen Katheter intraaortal infundiert. Dabei wurde die Infusionszeit von 95 sec. für 1 ml verwandt (Stufe 8). Gesammelt wurde das frei aus dem Nebennierenvenenkatheter abfließende Blut. Anzumerken ist, daß wir im Gegensatz zu früheren Arbeiten (10, 11) einen im Innendurchmesser größeren Venenkatheter benützten. Dadurch konnten wir einen eventuellen Blutrückstau in die Nebenniere und somit einen ungleichmäßigen Blutfluß sicherlich verhindern. Die durchschnittliche Menge bei 8 Minuten Fließzeit lag bei unseren Versuchen im Mittel bei ca. $0,82 \pm 0,074$ ml ($\bar{x} \pm s$). Das Vollblut wurde in Wintrobe Haematokritröhrchen

gesammelt und 15 Minuten bei 1500 G zentrifugiert. Das Plasma wurde mit einer Tuberkulinspritze aufgesaugt, mit aqua dest. auf 1 ml Volumen gebracht und nach Vermischen 0,5 ml in je ein Probenglas gebracht (Doppelbestimmung). Sodann wurde die Spritze erneut mit aqua dest. zum Nachspülen auf 1 ml aufgefüllt und 0,5 ml in jedes Glas gegeben, so daß sich jetzt 1 ml in jedem Probenglas befand.

Dieses so vorbereitete Plasma wurde entweder direkt zur Bestimmung verwandt oder bei -16°C eingefroren.

Über die zeitliche Reihenfolge der Infusions- bzw. Sammelperioden, die im Prinzip von früheren Arbeiten (10, 11) übernommen wurden, gibt die nachfolgende Abbildung 2 einen Überblick.

Für die Bestimmung einer zu testenden Probe unbekannter ACTH-Konzentration wurde jeweils ein neues Versuchstier benützt.

2.2 Fluorimetrische Corticosteronbestimmung

2.2.1 Laborgeräte und Reagentien

Beckman Spektralfluorimeter,
mit zwei Monochromatoren und Xenon-Hochdrucklampe
Mikroabsaugküvette nach Gerb (7), Fa. Hellma, Mühlheim/Baden
Kurze 20 ml Schliffgläser mit Stopfen, $\varnothing$ 2,5 cm x 9 cm
Lange Schliffgläser 20 ml graduirt mit Stopfen, $\varnothing$ 1,5 cm x 20 cm
Erlmeyerkolben mit Schliff 1 Liter
Tropftrichter 500 ml mit Druckausgleichsrohr, Schliff passend
auf den Erlmeyerkolben, Teflonhahn mit Schraubsicherung
Glasbecken 30 x 60 x 40 cm
Magnetrührer mit Teflonrührstab

Corticosteron, reinst, Fa. Fluka, Buchs/Schweiz
Äthanol abs., reinst, Fa. Merck, Darmstadt
Dichlormethan, "Rothitainer", Fa. Roth
Natronlauge 0, 1 N, Apothekenherstellung

Abbildung 2

Schematische Darstellung der Infusions- und Blutentnahmezeiten

laufende Zeit (Minuten)	Vorgang	Zeitdauer des Vorgangs (Min)
00.00	1. Infusion (NaCl-Lsg.)	1.35
01.35	Wartezeit	1.25
03.00	1. Blutentnahme (Corticosteron- Basiswert)	8.00
11.00	2. Infusion (0,22 ng ACTH als Testdosis)	1.35
12.35	Wartezeit	1.25
14.00	2. Blutentnahme (Anstieg auf Testdosis)	8.00
22.00	Pause	8.00
30.00	3. Infusion (NaCl-Lsg.)	1.35
31.35	Wartezeit	1.25
33.00	3. Blutentnahme (Corticosteron- Basiswert)	8.00
41.00	4. Infusion (die zu messenden Lösungen)	1.35
41.35	Wartezeit	1.25
43.00	4. Blutentnahme (Anstieg auf die zu messende Lsg.)	8.00

2.2.2 Methode

Die von Gerb (7) zur Routinebestimmung verbesserte fluorimetrische Cortisolbestimmung nach Spencer-Peet (36) wurde von uns zur Corticosteronbestimmung mit kleinen Modifikationen eingesetzt. Die Untersuchungen mit dem bei dieser Methode benutzten Beckman-Fluorimeter zeigten, daß das Absorptionsmaximum und das Emissionsmaximum bei den Wellenlängen 522 bzw. 464 nm optimal war. Die Spaltbreiten betrugen beim ersten Monochromator im Strahlengang 20 nm, beim zweiten 5 nm. Außerdem wurde die Mikroabsaugkuvette nach Gerb (7) zu den Bestimmungen verwandt.

Das Fluoreszenzreagens wurde durch Eintropfen von 350 ml H_2SO_4 in 150 ml Äthanol, unter ständigem Rühren mit dem Magnetrührer innerhalb von 2 Stunden hergestellt. Im Eisbad stehend wurde es bis zur Verwendung weiter gerührt.

Für eine Bestimmung kamen folgende Corticosteronstandards zur Verwendung:

0,05 μg / ml

0,03 μg / ml

0,01 μg / ml

ein Leerwert mit 1 ml aqua dest.

ein Kontrollserum 0,1 ml + 0,9 ml aqua dest.

2.2.3 Behandlung der Proben

In den dickbauchigen 20 ml-Gläsern wurde unter Verwendung von Rotoren mit 10 ml Dichlormethan 20 Minuten lang extrahiert. Nachdem die Proben einige Minuten standen, wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, mit 1 ml NaOH versetzt, 20 Sekunden geschüttelt und der verbleibende Überstand wiederum abgesaugt. Hierauf wurde der Extrakt in die graduierten Gläser umgeschüttet, auf 7,5 ml Volumen gebracht, 4,25 ml Fluoreszenzreagens zugegeben, 30 Sekunden geschüttelt, 80 Minuten stehen gelassen, die Dichlormethanphase abgesaugt und anschließend gemessen.

2.3 Ergebnisse der Corticosteronbestimmung

2.3.1 Corticosteroneichkurve

Die Standards, von denen 0,05 $\mu g/ml$ auf 100 % Transmission geeicht wurden, ergaben eine lineare Eichkurve. Der von uns als niedrigster Eichpunkt verwandte Wert von 0,005 μg ließ sich signifikant von Null unterscheiden.

Zum Nachweis der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode wurden 25 Bestimmungen mit jeweils 10 Doppelwerten durchgeführt. Dabei lag, wie aus Abbildung 3 und Tabelle 2 ersichtlich ist, die höchste Abwei-

chung beim Corticosteronstandardwert 0,03 μg mit $\pm 0,025 \mu\text{g}$ vor. In Transmissionsgraden ausgedrückt bedeutet dies eine Standardabweichung s von $\pm 5,78$ oder einem Variationskoeffizienten von 8,6 (siehe Kapitel 2.4).

Tabelle 2

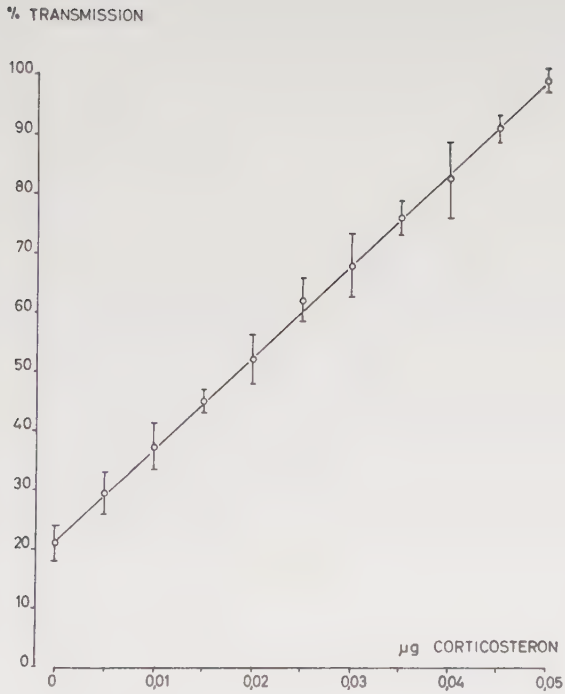
Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) bei der Messung von 10 verschiedenen Standards in 25 Bestimmungen

Standard (μg / ml)	Mittelwert $\bar{x}$ (% Transmission)	Standardabweichung s (% Transmission)
Leerwert	21,2	3,13
0,005	29,7	3,68
0,01	36,8	3,81
0,015	44,9	1,81
0,02	51,8	4,09
0,025	61,9	3,28
0,03	68,0	5,78
0,035	76,3	2,62
0,04	82,7	5,24
0,045	91,4	2,11
0,05	99,6	1,73

Dabei wurde der Corticosteronstandard 0,05 μg zur Eichung (100 %) verwandt.

Zur Routineuntersuchung erwies sich eine Eichkurve mit den Werten 0,01; 0,03; 0,05 μg sowie dem Leerwert als ausreichend.

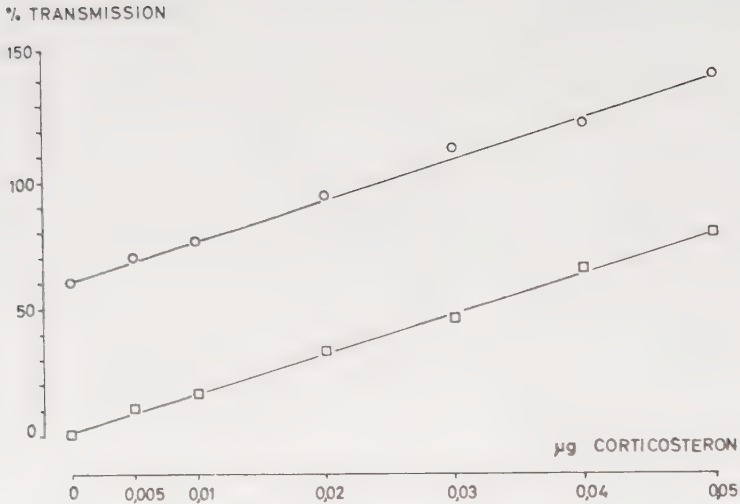
Abbildung 3



Corticosteron-Eichkurve

Diese Kurve setzt sich aus den Mittelwerten von 25 Bestimmungen mit jeweils 10 Doppelwerten zusammen. Eingetragen ist der jeweilige Mittelwert mit der Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$)

Abbildung 4



Corticosteron-Serum Wiederfindeversuch

□ = 1 ml Corticosteronstandard

○ = 1 ml Corticosteronstandard + 0,1 ml Serum

2.3.2 Die Richtigkeit der Methode wurde durch einen Wiederfindeversuch überprüft. Aus Standardeichlösungen wurde eine Eichkurve erstellt, und dazu wurde in einem zweiten Arbeitsgang zu diesen Werten je 0,1 ml eines Kontrollserums zugesetzt (Abbildung 4). Die Wiederfindekurve (Standards im Serum) läuft parallel zur Eichkurve; die Wiederfinderaten liegen also bei ca. 100 %.

2.3.3 Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde während der gesamten Arbeitszeit dadurch kontrolliert, daß bei jeder Bestimmung ein bekanntes Kontrollserum mitbestimmt wurde. Der Mittelwert $\bar{x}$ für dieses Serum lag bei 0,048 μg Corticosteron und die Standardabweichung s bei $\pm 0,0041 \mu\text{g}$ ($N = 82$), damit ergab sich ein Variationskoeffizient von 8,54 %.

2.4 Statistik

Sämtliche in dieser Arbeit angegebenen Rechenwerte wurden mit einem Olivetti-Tischcomputer ermittelt. Es wurden dazu die vom Werk angegebenen Programme benutzt.

Die bei Bestimmungen zu ermittelnden Einzelwerte wurden ebenfalls nicht an graphischen Eichkurven abgelesen, sondern über die jeweils zugehörige Korrelationsgerade errechnet. Diese Berechnungen entsprachen folgenden statistischen Grundbegriffen:

x = Einzelwert

n = Anzahl der Einzelwerte

1. Mittelwert:

arithmetischer Mittelwert $\bar{x} = \bar{m} = \frac{\sum x}{n}$

2. Standardabweichung:

direkte Schätzung der Streuung $s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$

3. Variationskoeffizient:

Streuungsmaß einer konstanten Klassengröße $v = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}}$

Dieser Wert gilt nur dann als Maß, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- a) Die zur Quantifizierung der Beobachtung dienende Skala muß einen absoluten 0-Punkt haben;
- b) Diese Skala muß konstante Klassengrößen aufweisen.

2.4.1 Genauigkeit der Eichkurve

Zur Bestimmung der Genauigkeit einer Eichkurve wird in zahlreichen Arbeiten ein sogenannter Genauigkeitsindex λ (10) errechnet und an-

gegeben. Dieser Wert enthält jedoch nur eine Aussage für einen einzelnen Eichkurvenwert, bzw. Werte aus seiner unmittelbaren Nachbarschaft (22) und kann deshalb nicht für eine gesamte Eichkurve angewandt werden. (x)

(x) In diesem Zusammenhang möchte ich Herrn Prof.Dr. Fischer vom mathematischen Institut der Technischen Universität München für seine bereitwillige Hilfe herzlich danken.

3. Ergebnisse

3.1 Aufstellen einer ACTH-Eichkurve

Das von uns zum Erstellen der Eichkurve verwendete ACTH lag als 1 - 23 Corticotropintri-¹⁸kosidamidpeptid Acethrophan [®]-S (Hoechst) in Trockensubstanz vor (Ampullen zu 0,25 mg, Lagerung bei + 4°C). Zur Lösung gebracht wurde es in 1000 ml 0,9 % Kochsalzlsg., die mit 1 ml 0,1 N HCl angesäuert war. Die einzelnen Standardproben wurden durch sukzessives Verdünnen hergestellt und bei -18°C eingefroren. Bei dieser Temperatur blieben die Standards zumindest 3 Tage haltbar. Tiefgefrorene ACTH-Lösungen (-80°C) waren über die gesamte Dauer dieser Arbeit haltbar.

Die ungeraden Werte der Lösungen (z. B. 0,46 ng) sind darauf zurückzuführen, daß in den Vorgängerarbeiten (10, 11) zur graphischen Darstellung der Eichgeraden die Werte logarithmisch aufgetragen wurden. Nach Ausführung der angegebenen Versuchsanordnung ergab sich jedoch eine lineare Beziehung zwischen ACTH-Dosis und Corticosteronanstieg im NNV-Blut für den Bereich von 0 - 22 ng ACTH.

Zum weiteren sind wir von der Maßeinteilung I.E. abgegangen und haben mit Grammangaben gearbeitet. Nach Angabe des Herstellers galt dabei 1 g ACTH = 0,86 mJ.

Bei der Durchführung unserer Versuche stellten wir fest, daß nach Gabe des in früheren Arbeiten verwendeten (10, 11) Eichwertes (Abbildung 2) von 0,46 ng (früher 0,5 ng) der Corticosteronanstieg so groß war, daß der zweite Basiswert stets noch erhöht war. Mit der

Gabe von 0,22 ng erreichten wir einen genügenden Anstieg der Corticosteronausschüttung, wobei jedoch der Plasmaspiegel so schnell wieder abfiel, daß der zweite Basiswert dem ersten etwa entsprach, was zu fordern ist. Es war im übrigen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Anstieg auf die Gabe von 0,22 ng ACTH als Test- oder als Eichdosis festzustellen.

Zur Verwendung als Wert für die Eichkurve kam jeweils die Erhöhung der Corticosteronausscheidung nach Gabe der Testsubstanz im Vergleich zum vorhergegangenen O-Wert (2. Basiswert). Das Plasmavolumen war ebenfalls unabhängig von der Höhe der ACTH-Standardlösungen. Die im Mittel geflossene Plasmamenge lag bei $0,82 \pm 0,074$ ml ($\bar{x} \pm s$). Hier sei noch einmal hervorgehoben, daß nicht der Corticosteronspiegel im Nebennierenvenenblut zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen wurde, sondern die Corticosteronausscheidung über einem Zeitraum von 8 Minuten (Dauer der Blutsammelperiode).

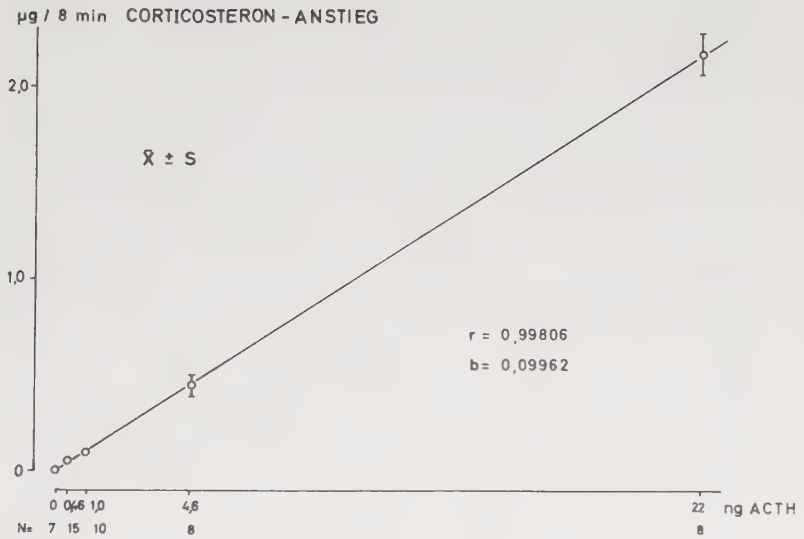
Nach Ausführung der angeführten Versuchsanordnung ergab sich eine lineare Beziehung zwischen ACTH-Dosis und Corticosteronanstieg im NNV-Blut für den Bereich von 0 - 22 ng ACTH (Abbildung 5 a + b). Aus der nachfolgenden Tabelle 3 läßt sich erkennen, daß der niedrigste Eichwert von 0,05 ng ACTH noch einen durchweg positiven Corticosteronresponse hervorgerufen hat und zumindest bei der angegebenen Zahl der Bestimmungen signifikant von Null zu unterscheiden war. Die untere Nachweisgrenze nach der 3s-Definition liegt unter 0,1 ng.

Tabelle 3

ACTH Dosis ng	Corticosteron- anstieg μg Mittelwert $\bar{x}$. . .	Standard- abweichung s	Anzahl N
0	-0,0002	0,0025	7
0,05	0,0037	0,0032	15
0,1	0,0095	0,0014	8
0,22	0,019	0,0081	24
0,46	0,043	0,01	15
1,0	0,085	0,0087	10
4,6	0,443	0,062	8
22	2,19	0,109	8

An der so erhaltenen Eichkurve wurden die untersuchten ACTH-Werte von Serum und lipolytisch wirksamen Fraktionen aus der Schweinehypophyse (30) anhand ihres Corticosteronanstieges direkt abgelesen.

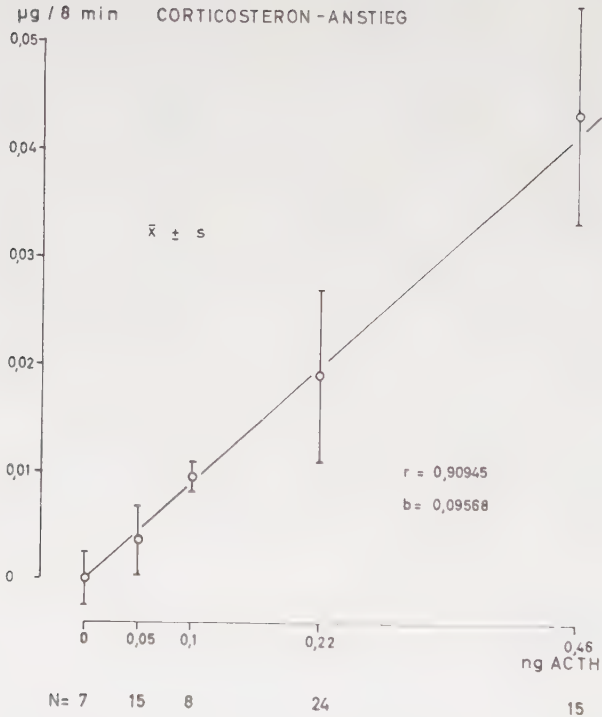
Abbildung 5a



ACTH-Eichkurve:

Diese Kurve gibt das Bild der kompletten Eichkurve von 0 - 22 ng ACTH wieder. Eingetragen sind die Mittelwerte $\bar{x}$ für alle Eichwerte und die Standardabweichung s ab 4,6 ng ACTH.

Abbildung 5b



ACTH-Eichkurve:

Diese Kurve gibt das Bild der Eichkurve im Bereich von 0 - 0,46 ng ACTH wieder. Eingetragen sind der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s.

3.1.1 Diskussion

Prinzipiell ist anzumerken, daß eine biologische Bestimmungsmethode immer größeren Schwankungen ausgesetzt ist, wie sie bei chemischen Bestimmungen nicht zu finden sind. Ein Großteil der mangelnden Genauigkeit ist darauf zurückzuführen, daß wir von Versuch zu Versuch andere Ratten verwenden müssen, wobei jedoch jedes einzelne Tier individuellen Schwankungen unterworfen ist. Aus diesem Grund haben wir die Tierhaltung dahingehend verbessert, daß die Tiere in klimagesteuerten Räumen bei ca. 24°C gehalten wurden. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist in der Hypophysektomie zu suchen. Freud (6) empfiehlt eine mikroskopische Untersuchung des Operationsgebietes. Dies jedoch erscheint aufgrund der ohnehin schon aufwendigen Versuchsanordnung zu zeitraubend. Wir verwandten als Kontrolle zunächst die makroskopische Revision des Operationsgebietes unter Entfernung des Schädeldaches und des Gehirns bereits nach Beendigung des Versuches. Eine weitere Kontrollmöglichkeit ergab sich dadurch, daß die nicht total hypophysektomierten Tiere einen wesentlich erhöhten Corticosteron-Basiswert zeigten. Zudem fanden wir dann noch Tiere, die zwar nicht total hypophysektomiert waren, aber einen niedrigen Corticosteron-Basiswert hatten. Diese zeigten zum Teil - wie auch schon früher beschrieben (11) - bei der Gabe des 0,22 ng ACTH-Kontrollwertes einen unverhältnismäßig hohen Corticosteronanstieg. Es handelte sich dabei um bis zum 100fachen des zu erwartenden Wertes. Deshalb wurden die an solchen Tieren ermittelten Ergebnisse ebenfalls eliminiert.

Eine weitere operationstechnische Verbesserung ergab sich in der Verwendung eines im Innendurchmesser größeren Venenkatheters. Dadurch ließ sich ein erheblich konstanterer Blutfluß erreichen (0,82 ml/8 min = $\bar{x}$ für sämtliche Blutentnahmen) und ein eventueller Blutrückstau in die Nebenniere verhindern.

Eine sehr viel genauere Corticosteronbestimmungsmethode, bei der der kleinste bestimmbare Wert bei 0,005 µg pro Ansatz lag, bot uns schließlich eine sehr gute Auswertungsmöglichkeit der Versuche.

Die von uns erarbeitete Eichkurve für ACTH ergibt eine lineare Beziehung zwischen ACTH-Dosis und Corticosteronausschüttung. Das gilt für

den Bereich von der niedrigsten Nachweisgrenze (0,05 ng ACTH) bis zur höchsten von uns untersuchten Dosis von 22 ng ACTH. Es zeigen sich beim Wert von 0,05 ng ACTH noch durchweg positive Anstiege. Bei Verwendung von mindestens drei Versuchstieren für die Proben unbekannter ACTH-Konzentration, wie dies bei unseren Untersuchungen durchgeführt wurde, ist die Differenz von 0,05 ng ACTH signifikant von Null zu unterscheiden.

Im Vergleich zu anderen Arbeiten (siehe Tabelle 1) ließ sich zwar keine sehr hohe Steigerung der Empfindlichkeit (dort 0,1 ng ACTH) herbeiführen, es wurde jedoch die Genauigkeit der Eichkurve wesentlich verbessert. Es fand sich jetzt eine mittlere Streuung der einzelnen Eichkurvenwerte von zum Teil nur ca. 10 - 20 %, während früher (10, 11) teilweise Schwankungen von über 150 % in Kauf genommen werden mußten.

Eine Verbesserung obiger Ergebnisse, vor allen Dingen der Empfindlichkeit, ist mittels einer biologischen Bestimmungsmethode nur in einem völlig anderen System zu erreichen. Hier liegen erste Ergebnisse an isolierten Nebennierenzellen der Ratten vor (28).

Es sind auch Radioimmunoassays für ACTH entwickelt worden. Wie jedoch u. a. von Fehm et al. (5) gezeigt werden konnte, sind die damit verbundenen Schwierigkeiten (direkte Bestimmung aus dem Serum) noch nicht überwunden, so daß noch keine routinemäßige ACTH-Bestimmung möglich ist. Darüber hinaus wird sicherlich eine biologische Bestimmungsmethode für ACTH erforderlich sein, da Differenzen zwischen biologischer und immunologischer Aktivität - wie auch bei anderen Peptidhormonen - zu erwarten und auch schon beschrieben sind (3).

3.2 ACTH-Spiegel von Patienten mit Nelsontumoren

3.2.1 Untersuchungsgang

Das Blut wurde aus der Vena Cubitalis gewonnen und sofort in mit Eis gekühlte Zentrifugengläser gegeben, sodann zentrifugiert (1500 G) und das Serum eingefroren. Dies wurde innerhalb von 3 Tagen zur Bestimmung

gebracht, da wir feststellen konnten, daß ebenso wie bei ACTH-Standard-Lösungen ein biologischer Aktivitätsabfall in Abhängigkeit von der Lagerungszeit stattfand. Wurde das Serum jedoch bei -80°C eingefroren, so behielt es seine Aktivität über Monate.

Bei der üblichen Lagerung (-18°C) konnte nach 2 Wochen keine meßbare Aktivität mehr festgestellt werden.

Die Blutentnahmen erfolgten präoperativ:

1. 6.00 Uhr nüchtern
2. 9.00 Uhr
3. Nach Abnahme des 9.00 Uhr-Wertes wurde den Patienten 0,1 E Altinsulin pro kg Körpergewicht i.v. verabreicht und um 9.45 Uhr wiederum Blut entnommen.
4. 6.00 Uhr nüchtern, nachdem die Patienten 2 Tage lang jeweils 4mal 0,5 mg Dexamethason (also alle 6 Stunden 0,5 mg) oral erhalten hatten.

Postoperativ wurde ein 6.00 Uhr-Nüchternwert ca. 8 Wochen nach der Hypophysektomie abgenommen und untersucht.

Durch die Gaben von Altinsulin (Stimulation) bzw. Dexamethason (Suppression) wollten wir feststellen, inwieweit die ACTH-Ausschüttung über den Hypothalamus bzw. die Hypophyse bei Patienten mit Nelsontumoren noch beeinflussbar ist. Dabei wurde durch die Gabe von 0,1 E Altinsulin pro kg Körpergewicht eine ausreichende Hypoglykämie (Blutzuckerspiegel im Serum $< 40 \text{ mg } \%$) erzielt.

3.2.2 Patientengut und Kasuistik

Die Patienten entstammten dem Krankengut unserer Klinik (M. K.) und dem der neurochirurgischen Universitätsklinik München (R. E., A. L., J. K.); dabei war es leider nicht möglich, bei allen Patienten das Programm vollständig durchzuführen.

Frau Maria K.:

Bei der 1938 geborenen Patientin wurde 1961 wegen eines Cushing-

Syndroms im Abstand von einem halben Jahr zunächst die linke und dann die rechte Nebenniere entfernt. Eine starke Hyperpigmentierung bestand schon seit Jahren. Eine hinzukommende Amenorrhoe (1968) ließ an einen Nelsontumor denken. Röntgenologisch ließ sich dann auch bereits 1971 eine ballonförmig erweiterte Sella nachweisen. Eine Progredienz wurde dann nicht mehr beobachtet, auch war kein Gesichtsfeldausfall nachweisbar, so daß bisher von einer Operation abgesehen wurde.

Fr1. Rosemarie E.:

Die 1945 geborene Patientin wurde 1966 wegen eines Cushing-Syndroms mit Nebennierenrinden-Hyperplasie beidseitig adrenalectomiert. Seit 1968 konnte eine zunehmende Hyperpigmentierung beobachtet werden. Außerdem zeigte sich jetzt eine ausgeprägte Sellavergrößerung, wobei jedoch ein supraselläres Wachstum ausgeschlossen werden konnte. Endokrine Untersuchungen zeigten keine Zeichen einer Hypophysenvorderlappeninsuffizienz bzw. eines Diabetes insipidus.

Die Patientin wurde auf trans-naso-sphenoidalem Weg am 19.8.1971 an der Hypophyse operiert, es konnte elektronenmikroskopisch ein ACTH-produzierendes Hypophysenadenom nachgewiesen werden.

Frau A. L.:

Die 1935 geborene Patientin wurde wegen eines Cushing-Syndroms aufgrund einer beidseitigen NNR-Hyperplasie im Mai und Juni 1964 total adrenalectomiert. Bei einer Kontrolluntersuchung 1968 fand sich eine starke Pigmentierung der Haut und Mundschleimhaut sowie röntgenologisch eine Erweiterung der Sella. In der Folgezeit kam es zur weiteren Zunahme der Pigmentierung. Die erneute Röntgenkontrollaufnahme ergab einen intrasellären Prozeß mit deutlicher Vertiefung des Sella-bodens. Im August 1971 wurde die Patientin auf trans-naso-sphenoidalem Wege an der Hypophyse operiert, wobei elektronenmikroskopisch ein ACTH-produzierender Hypophysentumor nachweisbar war.

Heir J. K.:

Wegen eines Cushing-Syndroms wurde der 1937 geborene Patient im No-

vember und Dezember 1966 beidseitig total adrenalectomiert. Es fand sich pathologisch anatomisch eine bilaterale adenomatöse Hyperplasie. Der Patient wurde seitdem in der üblichen Weise substituiert. 1968 wurde der Patient an der Hypophyse operiert, da röntgenologisch eine Vergrößerung der Sella festzustellen war. Es wurde ein ACTH-produzierender Tumor gefunden.

3.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Vorweg ist zu bemerken, daß die geringe Anzahl von Patienten keine statistisch verwertbaren Schlüsse zuläßt, sondern daß diese Ergebnisse nur als richtungsweisend betrachtet werden können.

Wir fanden bei den 6.00 Uhr nüchtern ACTH-Spiegeln aller Patienten im Verhältnis zu den von manchen Autoren angegebenen "Normalwerten" (Übersicht: 2) extrem hohe Werte. Sie lagen im Bereich von 1,98 ng ACTH/ml (A. L. postoperativ) bis 15,01 ng ACTH/ml (R. E. 6.00 Uhr nüchtern). Die Tabelle 4 gibt sämtliche untersuchten Serumwerte wieder, wobei für jeden Wert der Mittelwert $\bar{x}$ aus drei Bestimmungen und die zugehörige Standardabweichung s angegeben ist. Von nahezu allen Seren wurden Verdünnungen bestimmt, mit einer absoluten Serummenge von 0,2 ml und 0,1 ml. Die zugehörigen Werte sind ebenfalls aus Tabelle 4 ersichtlich. Die graphische Darstellung einer solchen Verdünnungsreihe mit den Einzelwerten und dem daraus gebildeten Mittelwert $\bar{x}$ gibt Abbildung 6 wieder. Hierbei zeigt sich, daß die Verdünnungen auf der Eichkurve liegen, d. h. praktisch unabhängig von der jeweiligen Serumverdünnung etwa derselbe Wert pro konstanter Serummenge gemessen wurde. Die Streuung der Einzelwerte in Bezug auf den jeweiligen Mittelwert zeigte annähernd die gleichen Schwankungen, wie sie auch schon in der ACTH-Eichkurve für die Einzelwerte gefunden wurden. Grobe Schwankungen zeigen lediglich die Werte M. K. 6.00 Uhr nüchtern und R. E. postoperativ. Dafür bot sich uns keine Erklärung an.

Eine sogenannte Tagesrhythmik der ACTH-Ausschüttung läßt sich beim Vergleich der 6.00 Uhr-Nüchternwerte

R. E. 15,01 ng ACTH/ml; A. L. 2,22 ng ACTH/ml
mit den 9.00 Uhr-Werten

R. E. 13,94 ng ACTH/ml; A. L. 2,31 ng ACTH/ml
nicht eindeutig erkennen. Die Differenzen fallen in den Bereich der
Meßungenauigkeit.

Durch die Gabe von Altinsulin, als Stimulationstest der ACTH-Sekretion konnte bei diesen Patienten keine weitere Zunahme der ACTH-Ausschüttung erzielt werden.

Ausgangswerte 9.00 Uhr

R. E. 13,94 ng ACTH/ml; A. L. 2,31 ng ACTH/ml
45 Min. nach Altinsulin i.v.

R. E. 13,33 ng ACTH/ml; A. L. 2,44 ng ACTH/ml
Beim Versuch, die ACTH-Sekretion durch Dexamethason zu supprimieren, ergab sich eine nur geringe Erniedrigung der ACTH-Spiegel.
6.00 Uhr-Nüchternwerte

R. E. 15,01 ng ACTH/ml; M. K. 2,81 ng ACTH/ml
nach Dexamethason

R. E. 11,40 ng ACTH/ml; M. K. 2,03 ng ACTH/ml
Diese Abnahme liegt jedoch an der Grenze der Bestimmungsgenauigkeit, so daß nur eine größere Anzahl von Patienten exaktere Schlüsse auf eine etwaige - wenn auch nur geringgradige - Supprimierbarkeit zulassen würden.

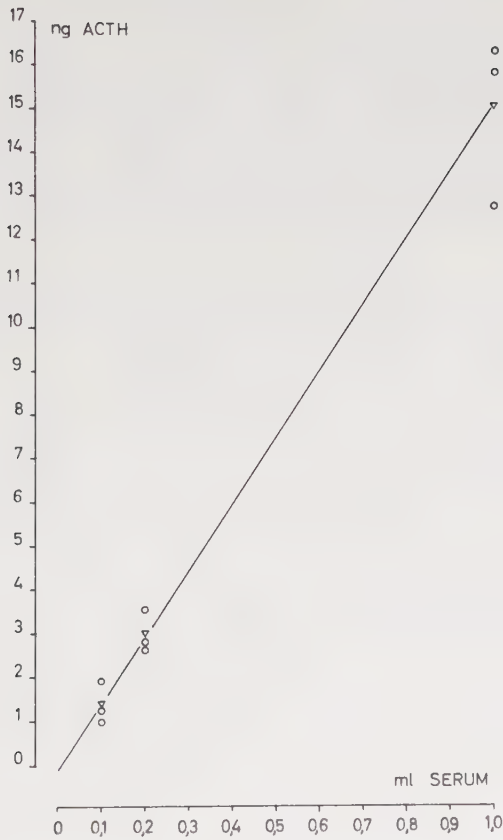
Dennoch lassen diese von uns gefundenen Ergebnisse der fehlenden Stimulation und der höchstens geringgradigen Suppression der ACTH-Spiegel bei Patienten mit Nelsontumoren den Schluß zu, daß es sich funktionell um eine Autonomie der ACTH-Sekretion handeln dürfte.

Bei den Werten 8 Wochen postoperativ sahen wir keinen erkennbaren Abfall der ACTH-Serumspiegel
präoperativ

R. E. 15,01 ng ACTH/ml; A. L. 2,22 ng ACTH/ml
postoperativ

R. E. 14,78 ng ACTH/ml; A. L. 1,98 ng ACTH/ml

Abbildung 6



Verdünnungsreihe des 6.00 Uhr nüchtern Serums der Patientin R. E.

○ = Einzelbestimmungswert

▽ = Mittelwert aus 3 Einzelbestimmungen

Die eingezeichnete Gerade entspricht der ACTH-Eichkurve.

Tabelle 4

	Patienten:		
	R. E.	A. L.	M. K.
<u>Präoperative ACTH-Serumspiegel (ng ACTH)</u>			
6.00 Uhr nüchtern	<u>15,01</u> ± 1,59	<u>2,22</u> ± 0,40	<u>2,81</u> ± 0,28
	2,98 ± 0,40	0,42 ± 0,05	0,89 ± 0,11
	1,36 ± 0,38	0,21 ± 0,02	0,31 ± 0
9.00 Uhr	<u>13,94</u> ± 0,45	<u>2,31</u> ± 0,26	
	2,35 ± 0,66		
	0,93 ± 0,25		
45 min. nach Insulin (9.45)	<u>13,13</u> ± 0,68	<u>2,44</u> ± 1,21	
	2,09 ± 0,22	0,43 ± 0,12	
	1,08 ± 0,27		
Nach Dexamethason 6.00 Uhr nüchtern	<u>11,40</u> ± 0,64		<u>2,03</u> ± 0,08
	1,85 ± 0,47		0,36 ± 0,01
	0,60 ± 0,20		0,20 ± 0,01
<u>Postoperative ACTH-Serumspiegel (ng ACTH)</u>			
6.00 Uhr nüchtern	<u>14,78</u> ± 0,85	<u>1,98</u> ± 0,13	keine Op.
	1,87 ± 0,24	(0,2 ml Serum)	
Patient J. K. präop. 6.00 Uhr nüchtern (0,31)			
postop. 6.00 Uhr nüchtern			
3,82 ± 0,21			

In der Tabelle sind jeweils der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s angegeben. Bestimmt wurden die ACTH-Spiegel von 1 ml, 0,2 ml und 0,1 ml des einzelnen Serums. Der Mittelwert wurde aus 3 Bestimmungen errechnet. Abweichungen sind aus der Tabelle ersichtlich. Der Wert J. K. präop. wurde bereits 1967 in einer Vorgängerarbeit (11) ermittelt und kann deshalb nicht als präoperativer Vergleichswert herangezogen werden.

Die Schwierigkeiten, bei hormonaktiven Tumoren der Hypophyse die Sekretion des betreffenden Hormons durch eine möglichst vollständige operative Entfernung des Tumors zu unterbinden, sind uns insbesondere vom Krankheitsbild der Akromegalie her bekannt. Andererseits ist auch bekannt, daß die Empfindlichkeit und Beeinflußbarkeit (Unterdrückung) der STH-Sekretion durch hormonaktive HVL-Tumoren viel größer ist als die von ACTH. Daraus läßt sich vielleicht die noch viel schwierigere Unterbindung der ACTH-Sekretion bei Patienten mit Nelsontumoren gegenüber der Verringerung der STH-Sekretion bei den Patienten mit Akromegalie erklären.

3.3 Ergebnisse über die Untersuchung von lipoidmobilisierenden Peptidfraktionen aus Schweinehypophysen auf ACTH-Aktivität und Diskussion

Wir untersuchten die bei der Darstellung des lipotropen Peptids erhaltenen Fraktionen (Schwandt et al. 30, Tabelle 5). Diese wurden lyophilisiert und bei -16°C aufgehoben. Zur Bestimmung lösten wir diese Trockensubstanzen in 0,9 % NaCl-Lösung und froren sie wie ACTH-Lösungen ein.

Die in den einzelnen lipoidmobilisierenden Fraktionen gefundenen ACTH-Aktivitäten lagen ca. zwischen 12 (Peptid A_{Peak}) und 27 (Peptid J) ng ACTH pro 100 µg lyophilisierte Fraktion, sämtliche Werte finden sich in Tabelle 6.

Für die Untersuchung wurden 2 - 3 Wochen alte Fraktionen verwandt. Aber auch viermonatige Lagerung von Peptid A in Trockensubstanz führte zu keinem ACTH-Aktivitätsverlust. Es fand sich ein mit der frischen Fraktion A ($16,45 \pm 1,31$) fast identischer Wert von $18,56 \pm 1,47$ ng ACTH/100 µg. Nach neunwöchiger Lagerung in gelöstem Zustand bei -16°C jedoch war keine ACTH-Aktivität mehr nachweisbar. Die lipolytische Aktivität, gemessen an der Zunahme der freien Fettsäuren in vitro an Kaninchen (Schwandt et al. 30) dieser von uns bestimmten Fraktionen zeigte jedoch keine Veränderung in Abhängigkeit von Lagerung bzw. Lösung.

Das von uns zur Herstellung der Standardlösungen verwandte ACTH-Präparat Acetrophan[®] -S zeigte bei einer Dosis von 2,5 mg ACTH pro

Tier einen nur geringen Anstieg der freien Fettsäuren (ca. $0,05 \pm 0,15$ mval/l) und somit eine praktisch vernachlässigbare lipolytische Wirkung.

Tabelle 5

Schematische Darstellung der Extraktion der einzelnen lipolytischen Fraktionen aus Schweinehypophysen

Entsprechend früheren Arbeiten wurde aus lyophilisierten Schweinehypophysen der Rohextrakt Fraktion G hergestellt, aus dem dann die weiteren Reinigungsstufen gewonnen wurden. (Durchgeführt von Schwandt und Mitarbeitern, 30)

Lyophilisierte Schweinehypophysen

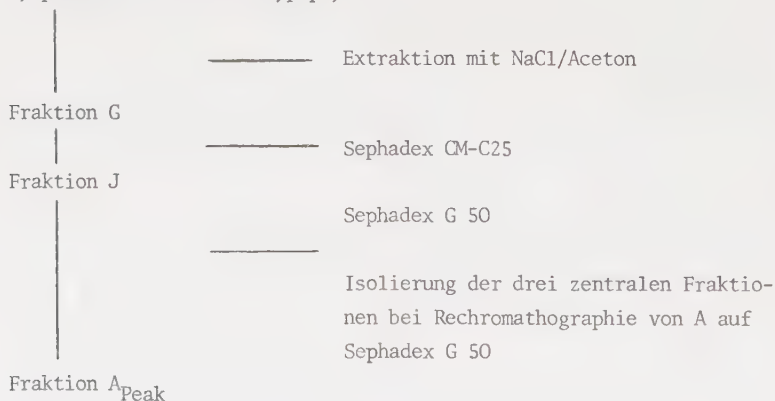


Tabelle 6

ACTH-Aktivitäten der lipoidmobilisierenden Fraktionen

Fraktion	ng ACTH-Aktivität ($\bar{x} \pm s$)	
	in 100 μ g	in 10 μ g
G	13,98 $\pm$ 0,51 N = 3	1,34 $\pm$ 0,08 N = 5
J	27,21 $\pm$ 7,31 N = 6	1,85 $\pm$ 0,13 N = 2
A	16,45 $\pm$ 1,31 N = 3	1,71 $\pm$ 0,15 N = 3
A _{Peak}	12,35 $\pm$ 2,79 N = 3	1,10 $\pm$ 0,13 N = 3

N = Anzahl der Einzelwerte

Von der Fraktion A_{Peak} wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, deren Werte sich aus der folgenden Tabelle 7 ablesen lassen.

Tabelle 7

Werte der ACTH-Aktivität der verschiedenen Verdünnungen von
Fraktion A_{peak}

eingesetzte Menge µg	ACTH-Aktivität in ng Einzelwerte	Mittelwert $\bar{x} \pm s$
100	15,46 12,89 8,70	$12,35 \pm 2,79$
10	1,23 1,14 0,92	$1,10 \pm 0,13$
5	0,72 0,71 0,69	$0,71 \pm 0,01$
1	0,21 0,12	$0,16 \pm 0,004$

Diskussion

Wir fanden zwar in allen untersuchten lipoidmobilisierenden Fraktionen ACTH-Aktivität, bei Bezug auf die eingesetzten Mengen würde sich jedoch lediglich ein ACTH-Gehalt von 0,1 - 0,3 O/OO ergeben. Nachdem jedoch eine 100fach höhere ACTH-Menge zu keinem Anstieg der freien Fettsäuren führte, ist die minimale ACTH-Aktivität nicht für die lipolytische Wirkung des Lipotropins und seiner Vorstufen verantwortlich zu machen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist die Frage nach ACTH-Kontamination oder ACTH-Wirkung der Lipotropine noch nicht endgültig zu beantworten. Zwei Befunde sprechen jedoch eher für eine Kontamination:

Einmal der Verlust der biologischen ACTH-Aktivität bei erhaltener

lipolytischer Wirkung bei der Lagerung in gelöstem Zustand. Ein weiterer Hinweis auf Kontamination ist der unterschiedliche ACTH-Gehalt in nach verschiedenen Verfahren gewonnenen Lipotropinfraktionen. Eine relativ gute Übereinstimmung mit unseren Befunden bezüglich der Höhe der ACTH-Verunreinigung findet sich u. a. in den Befunden von Rudman (24), Graf und Cseh (8); etwas höhere ACTH-Konzentrationen werden von Schleyer (29), Ryschka (25), Trygstad (37), Lohmar (17) angegeben. Alle Autoren stimmen jedoch weitgehend darin überein, daß die lipolytische Aktivität der verschiedenen Lipotropinfraktionen nicht durch diese ACTH-Kontaminationen erklärbar ist.

4. Zusammenfassung

1. Vor allem aufgrund einer verbesserten fluorimetrischen Corticosteronbestimmung (niedrigste Nachweisgrenze $0,005 \mu\text{g}$) konnten wir die Empfindlichkeit der biologischen ACTH-Bestimmung mittels des Corticosteronanstiegs im Nebennierenvenenblut der akut hypophysektomierten Ratte steigern und vor allen Dingen die Streuung der Einzelwerte erheblich vermindern. Es ergab sich eine lineare Beziehung zwischen ACTH-Dosis und Corticosteronanstieg.
2. Bei Patienten mit Nelsontumoren ($N = 4$) konnten wir wesentlich erhöhte Spiegel von ACTH im Serum finden. Diese ACTH-Serumspiegel waren weder durch eine Insulinhypoglykämie stimulierbar, noch durch Dexamethason wesentlich supprimierbar, was für die Autonomie dieser Tumoren spricht. 2 Patienten zeigten 8 Wochen nach trans-naso-sphenoidaler Hypophysektomie keine signifikante Erniedrigung des ACTH-Spiegels gegenüber den präoperativ gemessenen Werten, was die Schwierigkeiten der operativen Therapie von hormonaktiven Hypophysentumoren aufzeigt.
3. Die Frage nach der Eigenständigkeit eines sogenannten lipotropen Hormons der Hypophyse hängt wesentlich mit der Frage nach Verunreinigung solcher Präparationen mit lipolytisch wirksamen Hypophysenhormonen, insbesondere dem ACTH, zusammen. Unsere Untersuchungen an solchen Präparationen aus Schweinehypophysen (Peptid A mit seinen Vorstufen), ergaben zwar eine Verunreinigung mit ACTH, jedoch ist diese so gering, daß die lipolytische Aktivität dieser Fraktion nicht auf die lipolytische Wirkung der ACTH-Kontamination zurückgeführt werden kann. Der Beitrag des ACTH zur lipolytischen Wirkung dieser Fraktion liegt unterhalb von 1 %.

- 7 GERB, A.: Eine verbesserte fluorimetrische Methode zur Bestimmung von "Cortisolspiegeln" im Serum
Dissertation, Universität München (1969)
- 8 GRAF, L., G. CSEH, Lipotropic Hormons obtained from human
E. GOTH: pituitary gland.
FEBS Letters 2, 42-44 (1968)
- 9 GUILLEMIN, R., Fluorimetric measurement of rat plasma
et al.: and adrenal corticosterone concentration.
J. Lab. clin. Med. 53, 830 (1959)
- 10 HACKER, R.: Biologische Bestimmung der ACTH-Aktivität im menschlichen Plasma.
Dissertation, Universität München (1966)
- 11 KLUGE, F.J.: Zur biologischen Bestimmung von ACTH-Plasmaspiegeln. Verteilung von endogenem ACTH im Körper und Bindung an Serumproteine.
Dissertation, Universität München (1967)
- 12 LI, C.H., Isolation of adrenocorticotrophic hormone
H.M. EVANS and from sheep pituitaries
M.E. SIMPSON: Science 96, 450 (1942)
- 13 LI, C.H., Isolation and properties of alpha-corticotropin from sheep pituitary
J.J. GESCHWIND, glands.
A.L. LEVY, J. HARRIS, S. DIXON, N.G. PON Nature 173, 251-253 (1954)
and J.O. PORATH:

- 14 LI, C.H., Aminoacid sequence of alpha-corti-
J.J. GESCHWIND, cotropin
R.D. COLE, Nature 176, 684-687 (1955)
J.D. RAACKE,
J. HARRIS and
J.S. DIXON

- 15 LI, C.H., Synthesis of a biologically active
J. MEIENHOFER, nonadecapeptide corresponding to the
E. SCHNABEL, first nineteen aminoacid residues of
D. CHUNG, T. LO and adrenocorticotropins
J. RAMACHANDRAN: J. Am. Chem. Soc. 83, 4449-4457 (1961)

- 16 LIPSCOMB, H.S., Dynamic changes in ascorbic acid and
H.S. and D.H. NELSON: corticosteroids in adrenal vein blood
after ACTH.
Endocrinology 66, 144 (1960)

- 17 LOHMAR, P., Biological properties of ovine beta-
C.H. LI: lipotropic hormone.
Endocrinology 82, 898-904 (1968)

- 18 MÜLLER, O.A.: Zum Wirkungsmechanismus des Adrenocorti-
cotropen Hormons: Die subzelluläre Ver-
teilung von ³H-ACTH in der Rattenneben-
niere.
Dissertation, Universität München (1968)

- 19 MUNSON, P.L., and Detections of minute amounts of adreno-
W. TOEPEL: corticotropic hormone by the effect on
adrenal venous ascorbic acid.
Endocrinology 63, 785 (1958)

- 20 NELSON, D.H., J.G. SPRUNT, R.B. MIMS: Plasma ACTH determinations in 58 patients before or after adrenalectomy for Cushing's syndrome
J. clin. Endocr. 26, 722 (1966)
- 21 NELSON, D.H. and D. M. HUME: Corticosteroid secretion in the adrenal venous blood of the hypophysectomized dog as an assay for ACTH
Endocrinology 88, 696 (1955)
- 22 ODELL, W.D., W.H. DAUGHADAY: Principles of Competitive Protein-Binding-Assays
(Editors) J.B. Lippincott Comp., Philadelphia and Toronto, 164, 1971
- 23 PFEIFFER, E.F., W.E. VAUBEL, K. RETIENNE, D. BERG und H. DITSCHUNEIT: ACTH-Bestimmung mittels Messung des Plasma-Corticosterons der mit Dexamethason hypophysenblockierten Ratte.
Klin. Wschr. 38, 980 (1960)
- 24 RUDMAN, D., F. SEIDMAN, M.B. REID: Lipemia-producing activity of pituitary gland: Separation of lipemia-producing component from other pituitary hormones.
Proc. Soc. exp. Biol. 103, 315-320 (1960)
- 25 RYSCHKA, F.J. A.S. CHOCHLOW: Reinigung und Untersuchung des Lipotropins aus Hypophysen verschiedener Species
Biochimija 30, 1277-1284 (1965) (russ.)
- 26 SAFFRAN, M., and A.V. SCHALLY: In vitro bioassay of corticotropin: Modification and statistical treatment
Endocrinology 56, 523 (1955)

- 27 SAYERS, M.A., The assay of adrenocorticotrophic
G. SAYERS and hormone by the adrenal ascorbic acid-
L.A. WOODBURY: depletion meth
Endocrinology 42, 379-393 (1948)
- 28 SAYERS, G., An Improved Technique for the Preparat-
R.L. SWALLOW and ion of Isolated Rat Adrenal Cells:
N.D. GIORDANO: A sensitive, Accurate and Specific
Method for the Assay of ACTH
Endocrinology 88, 1063 (1971)
- 29 SCHLEYER, M., Studies on the pituitary "Fettstoff-
W. EVERTZ, wechselhormon", III. The corticotropic
K.H. VOIGT, H.L.FEHM, activity of some lipolytic effective
J.D. FAULHABER, hog pituitary gland fractions in vivo.
E.F. PFEIFFER: Horm. Metab. Res. 2, 333-337 (1970)
- 30 SCHWANDT, P., Darstellung eines lipolytisch wirksa-
P. WEISWEILER, men Polypeptides (Peptid A) aus Hypo-
R. LAMERZ: physen vom Schwein
Z. ges. exp. Med. 155, 195-203 (1971)
- 31 SCHWYZER, R., und Synthese eines Tetracosapeptides mit
H. KAPPLER: hoher corticotroper Wirksamkeit: beta
1-24 Corticotropin
Helvetica Chem. Acta 46, 1550 (1963)
- 32 SCHWYZER, R. und Total Synthesis of adrenocorticotrophic
P. SIEBER: hormone
Nature 199, 172 (1963)

6. Lebenslauf

Ich wurde am 20.6.1946 in Kirchseeon geboren. 1951 übersiedelten meine Eltern, Erwin Pister und Hildegard Pister, geb. Enders, nach München. Hier besuchte ich bis 1955 die Grundschule und legte 1964 das Abitur an der Luitpold-Oberrealschule ab. Nach Ableistung des Wehrdienstes begann ich 1966 mein Medizinstudium an der Universität München, das ich im August 1973 mit dem Staatsexamen abschloß.

